

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004年11月25日 (25.11.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/101787 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/11, A61K 48/00, 31/7088, A61P 25/14
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/006360
- (22) 国際出願日: 2004年4月30日 (30.04.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2003-136477 2003年5月14日 (14.05.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 金澤 一郎 (KANAZAWA, Ichiro) [JP/JP]; 〒1450071 東京都大田区田園調布一丁目47番17号 Tokyo (JP). 劉万兆 (LIU, Wanzhao) [CN/JP]; 〒1200005 東京都足立区綾瀬二丁目18番3-102号 Tokyo (JP). 王玉来 (WANG, Yu-Lai) [CN/JP]; 〒1878551 東京都小平市小川東町4-1-1-M Tokyo (JP). 和田 圭司 (WADA, Keiji) [JP/JP]; 〒1878502 東京都小平市小川東町4-1-1-I-301 Tokyo (JP). 後藤 順 (GOTO, Jun) [JP/JP]; 〒1130021 東京都文京区本駒込1丁目14番1号 Tokyo (JP). 村田 美穂 (MURATA, Miho) [JP/JP]; 〒1730026 東京都板橋区中丸町44番地7号605号 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目8番5号若林ビル3階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 規則4.17に規定する申立て:  
— すべての指定国のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書  
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: INHIBITION OF THE EXPRESSION OF HUNTINGTON GENE

(54) 発明の名称: ハンチンチン遺伝子の発現抑制

(57) Abstract: It is intended to provide a method of inhibiting the expression of a Huntington gene by using a double-stranded RNA (dsRNA); a Huntington gene expression inhibitor to be used in the inhibition of the expression of a Huntington gene as described above; and a drug for preventing and/or treating Huntington's disease. Targeting to a specific mRNA sequence located in a region in the upstream vicinity of the CAG repeat of an HD gene of Huntington's disease, the expression of the Huntington gene is inhibited with the use of a dsRNA that is homologous with this sequence. In this method, use can be effectively made of a short siRNA (short double-stranded RNA) of about 21 to 23 bp as the dsRNA homologous to the RNA-specific sequence located in a region in the upstream vicinity of the CAG repeat. Huntington's disease can be prevented and/or treated by administering or transferring the above-described dsRNA into a living mammalian body or a vital cell as a Huntington gene expression inhibitor or a preventive and/or a remedy for Huntington's disease.

(57) 要約: 二重鎖RNA (dsRNA) を用いたハンチンチン遺伝子の発現抑制方法、及び、該ハンチンチン遺伝子の発現抑制に用いるハンチンチン遺伝子の発現抑制剤、ハンチントン病予防及び/又は治療薬を提供するものである。ハンチントン病のHD遺伝子のCAGリピートの上流近傍領域にあるmRNAの特異配列を標的として、該配列に相同なdsRNAを用いて、ハンチンチン遺伝子の発現抑制を行う。本発明においては、CAGリピートの上流近傍領域のRNA特異配列に相同なdsRNAとして、bpが約21~23のように短いsiRNA (短二重鎖RNA) を特に効果的に用いることができる。本発明のdsRNAは、ハンチンチン遺伝子の発現抑制剤として、或いはハンチントン病の予防及び/又は治療薬として、哺乳動物の生体或いは生体細胞に、投与或いは導入して、ハンチントン病の予防及び/又は治療を行うことができる。

## 明 細 書

## ハンチンチン遺伝子の発現抑制

## 5 技術分野

本発明は、RNA i (RNA interference: RNA 干渉) 法を利用するものであって、ハンチンチン遺伝子の発現を抑制することができる、ハンチンチン mRNA の標的となる特定配列に相同なセンス鎖 RNA とアンチセンス鎖 RNA からなる二重鎖 RNA (siRNA: small interfering RNA)、該二重鎖 RNA からなるハンチンチン遺伝子の発現抑制剤、該発現抑制剤を有効成分として含有するハンチントン病の予防及び／又は治療薬等に関する。

## 背景技術

15     ハンチントン病 (HD) は、運動障害、認識喪失及び精神医学症状発現を特徴とする進行性の神経変性障害である (J. Med. 315, 1267-1276, 1986)。この病気は、普通、年齢 30 ～ 50 歳の中年で発症するが、ある場合には非常に早期に、又は前記年齢よりも遅い時期に発症する場合もある。病徴は進行性であり、殆んどの場合は、運動障害の続発性の合併症の結果として発症の 10 ～ 20 年後に死を招来する。ハンチントン病個体の脳の死後調査により、線条体に影響するニューロンの選択的喪失が判明している。ハンチントン病の原因遺伝子であるハンチンチン遺伝子は、ヒトでは染色体 4 の短腕における末端の細胞遺伝子学的サブバンド内にある loci D4S126 及び D4S98 に挟まれた 2.2 Mb  
20     領域にマッピングされている (Neuron 3, 183-190, 1989, J. Hum. Genet. 49, 7-16, 1991, Am. J. Hum. Genet. 51, 357-362, 1992)。

ハンチントン病は、ハンチンチン遺伝子転写の第1エクソンにおいてCAGリピートが伸長し、ポリグルタミン (poly Q) トラクトに翻訳され、その結果脳線条体神経細胞が進行的に喪失することに因る遺伝性の神経変性疾患である (Annu. Rev. Med. 47, 201-209, 1996)。すなわち

5、ハンチントン病は、ハンチンチン遺伝子の第1エクソン部位上の非定常的なCAGリピートの伸長によって引き起こされ、選択的脳線条体神経の死 (loss) に至る。ハンチンチン遺伝子は、ハンチンチンという分子量348 kDaの細胞質タンパク質をコードし、中枢神経系 (CNS) 及び非中枢神経系 (non-CNS) 組織の両方において広く発現している。

10、ハンチンチンタンパク質において、HD遺伝子のCAG3連配列 (CAG triplets) はポリグルタミン (poly Q) に翻訳される。一般的に、正常及びミュータント (変異) ハンチンチンアレル中に、それぞれ6~37、35~180のCAGリピートが含まれる。

昨今、ハンチントン病に対する処置方法として、ハンチンチン遺伝子を

15、処置したり、ハンチンチン遺伝子をターゲッティングにした方法、或いは、ハンチンチン遺伝子の発現するハンチンチンタンパク質に拮抗する物質を用いた方法等が開示されている。例えば、特開平7-67661号公報には、患者の細胞に正常なハンチンチンタンパク質を発現するDNAを導入して、ミュータントハンチンチン遺伝子を正常な遺伝子で

20置換する方法や、患者の細胞にハンチントン病のハンチンチン遺伝子のアンチセンスRNAを転写・発現可能な配列をコードする遺伝子を導入する方法、或いはハンチントン病のハンチンチンタンパク質にアンタゴニストを投与する方法等の処置方法が開示されている。また、特表2003-503008号公報には、ハンチントン病のような常染色体優性

25疾患に対する処置方法として、ハンチントン病のRNAを標的とした対立遺伝子特異的ターゲッティングによる処置方法が開示されている。し

かし、これらの処置方法は、遺伝子導入の複雑さや安定性の問題、或いは得られる処置効果の面から、必ずしも期待通りのものとはなっていない。

一方、近年、ある種の生物（線虫：Caenorhabditis elegans）では、  
5 二重鎖RNAによって遺伝子の発現を特異的に阻害できることが見い出された（Nature 391, 806-811, 1998、WO 99 / 3 2 6 1 9）。この現象は、ある遺伝子と相同な、センスRNAとアンチセンスRNAからなる二重鎖RNA（double-strand RNA：ds RNA）が、その遺伝子の転写産物（mRNA）の相同部分を破壊するという現象で、RNAi（  
10 RNA interference）と呼ばれている。この現象は、その後、種々の動物（Cell 95, 1017-1026, 1998、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14687-14692, 1998、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 5049-5054, 1999）や、植物（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13959-13964, 1998）を含む下等な真核細胞において見い出されている。

15 RNAiは、発見された当初、哺乳動物細胞においては、約30bp以上のdsRNAを細胞内へ導入すると、細胞が本来持っている免疫機能によりアポトーシスを起こし、細胞が死んでしまうため、哺乳動物細胞での利用は困難と思われていた。しかし、2000年にマウス初期胚や哺乳動物培養細胞でも、RNAiが起こりうることが示され、RNA  
20 iの誘導機構そのものは、哺乳動物細胞にも存在することが明らかになってきた（FEBS Lett 479, 79-82, 2000、WO 01 / 3 6 6 4 6）。

このようなRNAiの機能を利用して、哺乳動物において、ある特定の遺伝子又は遺伝子群の発現を阻害することができれば有益であることは明らかである。多くの疾病（癌、内分泌疾患、免疫疾患など）は、哺乳動物の中で、ある特定の遺伝子又は遺伝子群が異常発現することによって起こるので、遺伝子又は遺伝子群の阻害は、これらの症状を治療す  
25



るために使用することができる。また、変異型タンパク質の発現に起因して疾病が発症することもあり、このような場合には、変異した対立遺伝子の発現を抑えることで、疾病の治療が可能となる。更に、このような遺伝子特異的な阻害は、例えば、H I Vなどのレトロウイルス（レト  
5   ロウイルス中のウイルス遺伝子は、それらの宿主のゲノム中に組み込まれて、発現される）によって引き起こされるウイルス疾患を治療するためにも使用し得る。

R N A i の機能を引き起こす d s R N A は、当初、約 3 0 b p 以上の d s R N A の細胞内への導入が必要と考えられていたが、最近、更に短  
10   い（2 1 ～ 2 3 b p）の d s R N A（短二重鎖 R N A：s i R N A：small interfering RNA）が、哺乳動物細胞系でも細胞毒性を示さずに R N A i を誘導できることが明らかになった（Nature 411, 494-498, 2001）。s i R N A は、体細胞の全ての発生段階において遺伝子の発現を抑制する強力な手段として認識されており、進行性の遺伝病等において、発病す  
15   る前に、病気の原因となる遺伝子の発現を抑制する方法として期待し得る。しかし、今までこのような d s R N A による遺伝子特異的な遺伝子発現の抑制方法をハンチントン病（H D）の遺伝病に効果的に適用した報告はなされていない。

本発明の課題は、ハンチンチン遺伝子の発現を抑制することができる、  
20   ハンチンチン m R N A の標的となる特定配列に相同なセンス鎖 R N A とアンチセンス鎖 R N A からなる二重鎖 R N A（s i R N A）、該二重鎖 R N A からなるハンチンチン遺伝子の発現抑制剤、該発現抑制剤を有効成分として含有するハンチントン病の予防及び／又は治療薬等提供することにある。

25   ハンチントン病は、H D 遺伝子転写の第 1 エクソンにおいて C A G リピートが伸長し、ポリグルタミン（poly Q）トラクトに翻訳され、その

結果脳線条体神経細胞が進行的に喪失することによる遺伝性の神経変性疾患である。本発明者らは、CAGリピートの上流のハンチンチンmRNAを調べたところ、siRNAの有効な標的である独特な配列を有する2つの部位を見出した。そこで、この配列に相同なdsRNA配列として：a) 5'非翻訳領域を標的としたsiRNA-5'UTR、及び、b) CAGリピートの上流近傍領域を標的としたsiRNA-HDエクソン1、更に、c) 現在知られている通常のハンチンチン遺伝子とミュータントハンチンチン遺伝子との唯一の相違点はCAGリピートの長さであることから、CAGリピートを直接標的にするsiRNA-CAGの3種類のsiRNAを作製し、該siRNAの影響について培養組織モデルや、ハンチントン病モデルマウスを用いることにより解析したところ、siRNA-HDエクソン1が極めて効果的にハンチンチン遺伝子の発現を抑制し、ハンチントン病の発症を抑制することを見出し、本発明を完成するに至った。

#### 発明の開示

すなわち本発明は、(1) ハンチンチン遺伝子の発現を抑制することができる、ハンチンチンmRNAの標的となる特定配列に相同なセンス鎖RNAとアンチセンス鎖RNAからなることを特徴とする二重鎖RNAや、(2) ハンチンチンmRNAの標的となる特定配列が、配列表の配列番号1に示される塩基配列に由来するRNAからなる(1)記載の二重鎖RNAや、(3)ハンチンチンmRNAの標的となる特定配列が、19～24bpの塩基配列である(1)又は(2)記載の二重鎖RNAや、(4)配列表の配列番号1に示される塩基配列に由来するRNAが、ハンチンチン遺伝子のエクソン1のCAGリピートの上流近傍の領域に由来するRNAである(1)～(3)のいずれか記載の二重鎖RNAや、

(5) ハンチンチン遺伝子のエクソン1のCAGリピートの上流近傍の領域に由来するRNAが、配列表の配列番号3に示される塩基配列及び配列表の配列番号4に示される塩基配列からなる(1)～(4)のいずれか記載の二重鎖RNAや、(6)配列表の配列番号3に示される塩基配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換或いは付加された塩基配列と該塩基配列に相補的な塩基配列からなる(1)記載の二重鎖RNAや、(7)合成により製造されたセンス鎖RNAとアンチセンス鎖RNAから形成された(1)～(6)のいずれか記載の二重鎖RNAや、(8)遺伝子組換え方法を用いることにより製造されたセンス鎖RNAとアンチセンス鎖RNAから形成された(1)～(6)のいずれか記載の二重鎖RNAや、(9)遺伝子組換え方法を用いることにより製造されたセンス鎖RNAとアンチセンス鎖RNAが、それらRNAをそれぞれ転写することができるDNAを組み込んだ発現ベクターを宿主細胞に導入し、生成されたRNAを取得することによって形成されたものである(8)記載の二重鎖RNAに関する。

また本発明は、(10)上記(1)～(9)のいずれか記載の二重鎖RNAからなるハンチンチン遺伝子の発現抑制剤や、(11)上記(1)～(9)のいずれか記載の二重鎖RNAを、HIV-1由来の protein transduction domain であるTAT配列に付加した融合物からなるハンチンチン遺伝子の発現抑制剤や、(12)上記(1)～(9)のいずれか記載の二重鎖RNAと、正電荷リボソーム/脂質との複合体からなるハンチンチン遺伝子の発現抑制剤や、(13)上記(1)～(6)のいずれか記載の二重鎖RNAを転写することができるDNAを組み込んだ発現ベクターからなるハンチンチン遺伝子の発現抑制剤に関する。

更に本発明は、(14)上記(10)～(13)のいずれか記載の発現抑制剤を哺乳動物の生体或いは生体細胞に導入する哺乳動物の生体或

いは生体細胞におけるハンチンチン遺伝子の発現を抑制する方法や、  
（１５）上記（１０）～（１３）のいずれか記載の発現抑制剤を有効成分として含有するハンチントン病の予防及び／又は治療薬や、（１６）さらに薬学的に許容される担体を含む（１５）記載のハンチントン病の  
5 予防及び／又は治療薬や、（１７）上記（１５）又は（１６）記載のハンチントン病の予防及び／又は治療薬を、哺乳動物の生体或いは生体細胞に導入するハンチントン病の発症の予防及び／又は治療方法に関する。

#### 図面の簡単な説明

10 第１図、本発明の実施例における、s i R N A s 及び標的部位の配列を示す写真である。

第２図は、本発明の実施例における、s i R N A の標的部位と pd1EGFP N1 の発現コンストラクトを示す写真である。なお、a は、s i R N A を用いた標的部位（黒い矢印）を、b は、pd1EGFP N1 プラスミドを、c は、  
15 さまざまな数のC A Gリピート（poly Q）を含むH Dエクソン１を挿入した pd1EGFP N1 の発現コンストラクトを示す写真である。

第３図は、本発明の実施例における、s i R N A－H Dエクソン１をコトランスフェクトしたC O S－７細胞の蛍光顕微鏡による観察を示す写真である。

20 第４図は、本発明の実施例における、s i R N A－５'U T RをコトランスフェクトしたC O S－７細胞の蛍光顕微鏡による観察を示す写真である。

第５図は、本発明の実施例における、s i R N A－C A GをコトランスフェクトしたC O S－７細胞の蛍光顕微鏡による観察を示す写真である。  
25 第６図は、本発明の実施例における、s i R N A－C A Gをコトラン



スフェクトしたCOS-7細胞の蛍光顕微鏡による観察を示す写真である。なお、aは、未処理のコントロール（4つの独立した実験）をEGFP光の平均値で標準化することにより、siRNAの効果及びsiRNAの効果は標的位置と細胞種により異なることを示した図を、bは、  
5 親ベクター（HDエクソン1なし）をそれぞれ3種のsiRNAとコントロールスフェクトした結果を、cは、未処理のコントロールに対する、HD、 $\beta$ -アクチン、GAPDHのmRNA量の相対的平均を示す写真である。

第7図は、本発明の実施例における、siRNA-HDエクソン治療  
10 群のR6/2マウスが14週齢の時点で体重の減少が有意に抑えられたことを示す写真である。siRNA-HDエクソン治療群と未治療群を比較すると、野生型タイプ（WT；黒バー）に比べて、未治療群（グレーバー）の体重が顕著に減少していることに対し、治療群（赤バー）の方はわずかしき減少が見られない。

15 第8図は、本発明の実施例における、siRNA-HDエクソン治療群のR6/2マウスにおける生存期間が有意に伸びていたことを示す写真である。

第9図は、本発明の実施例における、siRNA-HDエクソン治療群のR6/2マウスに脳内注入48時間後線条体におけるミュータント  
20 ハンチンチンmRNAの発現量が抑制されたことを示す定量RT-PCRの結果の写真である。縦軸がミュータントハンチンチンのmRNAレベルの相対値を示し、グレーのバーが $\beta$ -アクチンを内部標準とし、赤のバーがGAPDHを内部標準とした値を示す。

第10図は、本発明の実施例における、siRNA-HDエクソン治療群のR6/2マウスにおいて線条体の神経細胞核内封入体の出現頻度  
25 が顕著に減少したことを示す写真である。A-Fは、抗ハンチンチン抗

体、G-Hは抗ユビキチン抗体で染まったことを示している。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の二重鎖RNAとしては、ハンチンチン遺伝子の発現を抑制することができる、ハンチンチンmRNAの標的となる特定配列に相同な  
5 センス鎖RNAとアンチセンス鎖RNAからなるものであれば特に制限されるものではなく、上記ハンチンチン遺伝子の由来としては特に限定されないがヒト由来のハンチンチン遺伝子が好ましい。かかるハンチンチン遺伝子としては、配列表の配列番号1に示される塩基配列からなる  
10 ハンチンチン遺伝子の第1エクソン（NCBIアクセッション番号 L12392及びNM\_002111の1～584番目；配列表の配列番号1、その遺伝子の対応するアミノ酸配列については、配列番号2に示される）（Cell 72, 6, 971-983, 1993）を例示することができる。

上記ハンチンチンmRNAの標的となる特定配列とは、ハンチンチン  
15 mRNAの特定の領域の部分配列、好ましくは19～24bp、より好ましくは21～23bp、特に好ましくは21bpの塩基長の部分配列をいい、かかるハンチンチンmRNAの標的配列としては、ハンチンチン遺伝子のエクソン1のCAGリピートの上流近傍の領域に由来するRNA、特に、配列表の配列番号1に示される塩基配列の343～363  
20 番目の塩基配列に由来するRNAを好適に例示することができる。

また、ハンチンチンmRNAの標的となる特定配列に相同なセンス鎖RNAとは、上記配列番号1に示される塩基配列の343～363番目の塩基配列などに由来するRNAをいい、ハンチンチンmRNAの標的となる特定配列に相同なアンチセンス鎖RNAとは、上記センス鎖RNA  
25 Aと相補的なRNAをいい、具体的には、センス鎖RNAとしては、GCCUUCGAGUCCCUCAAGUCC（配列番号3）を、アンチ

センス鎖RNAとしては、UCCGGAAGCUCAGGGAGUUC  
A（配列番号4）を好適に例示することができる。また、センス鎖RNA  
AとしてGAUGGACGGCCGCUCAGGUUU（配列番号5）  
を、アンチセンス鎖RNAとしてUUCUACCUUGCCGGCGAG  
5 UCCA（配列番号6）を挙げることもできる。

本発明の二重鎖RNAは、通常これらセンス鎖RNAとアンチセンス  
鎖RNA同士が結合したsiRNAとして構築されるが、便宜上、セン  
ス鎖RNA配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換或いは付加さ  
れた変異センス鎖RNA配列と該変異センス鎖RNA配列に相補的な変  
10 異アンチセンス鎖RNA配列とのsiRNAとして構築した二重鎖RNA  
も本発明の範囲に含まれる。上記「1又は数個の塩基が欠失、置換或  
いは付加された塩基配列」とは、例えば1～5個、好ましくは1～3個、  
より好ましくは1～2個、さらに好ましくは1個の任意の数の塩基が欠  
失、置換或いは付加された塩基配列を意味する。

15 本発明の二重鎖RNA（dsRNA）を作製するには、合成による方  
法及び遺伝子組換え技術を用いる方法等、公知の方法を適宜用いること  
ができる。合成による方法では、配列情報に基づき、常法により二重鎖  
RNAを合成することができる。また、遺伝子組換え技術を用いる方法  
では、センス鎖DNAやアンチセンス鎖DNAを組み込んだ発現ベクタ  
20 ーを構築し、該ベクターを宿主細胞に導入後、転写により生成されたセ  
ンス鎖RNAやアンチセンス鎖RNAをそれぞれ取得することによって  
作製することもできる。また、ハンチンチン遺伝子の特定配列のセンス  
鎖DNAーリンカーーアンチセンス鎖DNAを用いて、ヘアピン構造を  
形成するRNAを発現させることにより、所望の二重鎖RNAを作製す  
25 ることもできる。

本発明のハンチンチン遺伝子の発現抑制剤としては、上記本発明の二

重鎖RNA (dsRNA)、該二重鎖RNAをHIV-1由来のprotein transduction domainであるTAT配列に付加した融合物、該二重鎖RNAと正電荷リボソーム／脂質との複合体、又は該二重鎖RNAを転写することができるDNAを組み込んだ発現ベクターを挙げることができる。上記発現ベクターとしては、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルス (HSV) ベクター、アデノウイルスベクター、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) ベクター等のウイルスベクターや、動物細胞発現用プラスミドを挙げることができる。

本発明のハンチントン病の予防及び／又は治療薬としては、上記本発明のハンチンチン遺伝子の発現抑制剤を有効成分として含有するものであれば特に制限されないが、この分野で通常用いられる薬学的に許容される担体、例えば結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分とともに用いることができる。該薬学的に許容される担体とともに用いる薬学的組成物は、その投与形態、例えば経口（口腔内又は舌下を含む）投与、或いは非経口投与（注射剤等）等に合わせて、薬学の分野ではそれ自体周知の製剤形態で製剤化することができる。

また、本発明のハンチンチン遺伝子の発現抑制方法や、本発明のハンチントン病の予防及び／又は治療方法としては、上記本発明の発現抑制剤やハンチントン病の予防及び／又は治療薬を、哺乳動物の生体、組織又は細胞に導入する方法であれば特に制限されるものではなく、例えば、二重鎖RNAのそれぞれのRNAを転写する遺伝子、ヘアピン状の二重鎖RNAを転写する遺伝子を哺乳動物の生体或いは生体細胞に導入するには、それ自体公知の遺伝子導入方法によって行うことができる。例えば、以下の導入方法を挙げることができる。（1）脳内注入法：胎児期や新生児期に二重鎖RNA、siRNAを組み込んだ生体内で合成できる



既に公知のウイルスベクターやプラスミド、TAT-siRNA、正電荷リボソーム／脂質-siRNA複合体を直接に脳内注入する。成熟期に脳室内に投与する。(2)四肢や尻尾の静脈よりパルス注射法：短時間内に相当量の二重鎖RNA、siRNAを組み込んだ生体内で合成できる既に公知のウイルスベクターやプラスミド、正電荷リボソーム／脂質-siRNA複合体を注入する。(3)腹腔内投与法：siRNAを組み込んだ生体内で合成できる既に公知のウイルスベクター、TAT-siRNAを注入する。(4)鼻粘膜点滴導入法：二重鎖RNA、siRNAを組み込んだ生体内で合成できる既に公知のウイルスベクター、TAT-siRNAを鼻粘膜から吸収させる。

(実施例)

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

#### 実施例 1

##### 15 [材料及び方法]

(siRNAの作製) アンチセンス鎖RNAとしては、UCCGGAAGCUCAGGAGUUCA (配列番号 4)

ハンチンチン遺伝子のエクソン1領域 (NCBI アクセッション番号：L12392及びNM\_002111の1～584番目；配列番号 1) を基にして、3種類のRNAsを設計した (図1)。21ヌクレオチドからなる3種類のRNAs、すなわち (1) siRNA-HDエクソン1 センス鎖：配列番号1の343～363番目；GCCUUCGAGUCCCUCAAGUCC (配列番号3)、アンチセンス鎖：配列番号1の341～361番目に相補的；UCCGGAAGCUCAGGAGUUCA (配列番号4)、(2) siRNA-5'UTR センス鎖：配列番号1の190～210番目；GAUGGACGGCCGCU

C A G G U U U (配列番号 5)、アンチセンス鎖：配列番号 1 の 1 8 8  
～ 2 0 8 番目に相補的；U U C U A C C U G C C G G C G A G U C C A  
(配列番号 6)、(3) s i R N A - C A G センス鎖：配列番号 1 の  
3 6 7 ～ 3 8 7 番目；G C A G C A G C A G C A G C A G C A G C A (5  
配列番号 7)、アンチセンス鎖：配列番号 1 の 4 0 9 ～ 4 2 9 番目に相  
補的；G U C G U C G U C G U C G U C G U C G U C (配列番号 8)、  
すべて図 1 参照) を化学的に合成し、H P L C 精製を行った (Xeragon,  
USA)。二重鎖 s i R N A s は、アニーリングバッファー (1 0 0 m M 酢  
酸カリウム、2 m M 酢酸マグネシウム、3 0 m M H E P E S、0. 1 N  
10 水酸化カリウムで p H 7. 4 に調整、4 °C で保存) 中で、2 0 m M のセ  
ンス鎖及びアンチセンス鎖 R N A をアニールさせた。反応混合物を 9 5  
°C 5 分で反応させた後、1. 5 時間かけて 3 7 °C まで徐々に冷却し、  
6 ～ 2 0 時間室温下においた。アニール後の s i R N A s は、使用時ま  
で、- 2 0 °C 若しくは - 8 0 °C で保存した。

15 (プラスミドの構築)

5' U T R エクソン 1 及び H D エクソン 1 の 2 種類の発現ベクター  
を構築した。2 つのタイプのコンストラクトは、5' U T R を含むもの、  
又は含まないもの、そして、両タイプとも通常 (3 4 の C A G リピート  
を含む) 又は変異 (3 5 以上の C A G リピートを含む) H D 遺伝子を用  
20 いて作製した。コンストラクトは、ヒト H D 5' U T R 断片及びエクソ  
ン 1 の完全長 p d l E G F P - N 1 (de-stabled E G F P, Clontech) E G F P を持つ  
インフレームと融合させた (図 2 参照)。

(細胞系及び培地)

C O S - 7 細胞 (African green monkey fibroblasts: アフリカミド  
25 リザル繊維芽細胞)、S H - s y 5 y 細胞 (human neuroblastoma: ヒト  
神経芽細胞腫)、及び Neuro-2A 細胞 (mouse neuroblastoma: マウスヒト

神経芽細胞腫) のそれぞれ異なる起源を持つ 3 種の細胞系を用いた。C  
OS-7 細胞は、Minimum Essential Medium-Alpha Medium (Gibco BRL  
)、SH-sy5y 細胞及び Neuro-2A 細胞は、DMEM (Dulbecco's  
Modified Eagle's Medium) 培地 (Gibco BRL) 中でそれぞれ培養した。

- 5    5    なお、培地中には、10% 熱非動化ウシ胎児血清、10 U/mL ペニシ  
リン (明治製菓社製)、及び 50 µg/mL ストレプトマイシン (明治  
製菓社製) をそれぞれ含む。

(トランスフェクション)

- 10    トランスフェクション 24 時間前に播種した培養細胞を、抗生物質を  
含まない 10% FBS 含有培地中で増殖させた。2 種類のトランスフェ  
クション試薬を用いることにより、構造プラスミド及び siRNAs の  
細胞への導入を行った。

- 15    a. Effectene (Qiagen, Germany) : 細胞培養及びトランスフェクショ  
ン実験には、96 穴プレートを用いた。製造者の取扱説明書にしたがっ  
て、約 40~60% コンフルエントの細胞を、トランスフェクション前  
に 24 時間前培養した。0.5 µL の Effectene 試薬を各穴に添加し、2  
4 時間後に結果を解析した。

- 20    b. Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) : 製造者の取扱説明書にし  
たがって、約 80% コンフルエントの細胞を、トランスフェクション前  
に 24 時間の前培養を行った。0.3 µL の Lipofectamine 2000 試薬を  
各穴に添加した。

なお、a、b いずれの試薬を用いた実験においても、24~48 時間後  
に発現レベルを解析した。

- 25    c. ヒト内因性 HD 遺伝子発現の抑制に対する siRNAs の影響を調  
べるために、Lipofectamine 2000 試薬を用いて、siRNAs を SH-  
sy5y 細胞に導入した。トランスフェクション後 48 時間後に細胞を

回収し、全RNAをTrizol (Invitrogen, USA) を用いて抽出した。

(siRNA効果の定量的評価)

トランスフェクション後24時間及び48時間後に培養プレートを蛍光顕微鏡で観察した。siRNAの効果を定量的に評価するために、

5 Wallac 1420 ARVO sx (ParkinElmer, USA) 又はFluoreScan IIを用いて、GFP蛍光を測定した (励起: 485 nm、発光: 538 nm)。

(mRNAレベルの定量)

トランスジェニックHDエクソン1-E GFP mRNAの定量的解析は、LightCycler (Roche, USA) を用いたリアルタイムRT-PCRにより  
10 行った。SH-sy5y細胞の内因性HD発現におけるsiRNA-HDエクソン1の効果をLightCycler (Roche, USA) を用いた定量的RT-PCRにより測定した。コントロールとして、各サンプルごとのGAPDH及び $\beta$ -アクチンの発現レベルを定量した。

(哺乳類モデル動物)

15 ハンチントン病モデルマウス (系統名: B6CBA-Tg(HDexon1)62oGpb/J、一般名: R6/2、購入元: The Jackson Laboratory, USA) を用いた。このマウスはハンチンチン遺伝子の一部 (ハンチンチンプロモーター及び114個のCAGリピート領域を含む  
20 エクソン1) 約1 kbの長さのヒト遺伝子を導入したトランスジェニックマウスのF1のメスの卵巣を移植した hemizygote である。生後約9週から11週の間を発症し、臨床症状としては体重の減少、振戦、不安定歩行及び痙攣様発作などが示され、生後15週までに全例が死亡する。神経病理学的な所見としてほとんどすべての神経細胞の核内に抗ハンチンチン抗体及び抗ユビキチン抗体に染まる核内封入体が検出できる。

25 (生体内投与方法)

生後2日のマウスの脳内に50  $\mu$ lのハミルトンのシリンジでsiR



N A - H D エクソンとリポフェクタミン (Lipofectamine2000, Invitrogene, USA) とのコンプレクス  $5 \mu l$  の量 (約  $200 ng$  s i R N A - H D エクソン含有) を注入した。針の注入位置はプレグマより後方へは  $1 mm$ 、右方へは  $1 mm$  であり、注入の深さは  $2 mm$  である。

5 (生体内での s i R N A 効果の定量的評価)

m R N A レベルの定量：脳内投与後ミュータントハンチンチンの m R N A の定量的解析は、ABI 7700 sequence detector system (ABI, USA) を用いたリアルタイム R T - P C R により行った。プライマー配列：5' - C G C C G C C T C C T C A G C T T C C T - 3' (フォワード；配列  
10 番号 9)；5' - G C G G T G G T G G C G G C G G C G G C T - 3' (リバーズ；配列番号 10)。内部標準として G A P D H と  $\beta$  - アクチンを使用した。

病理組織学的定量解析：室温で P B S による 5 分間前灌流してから、4 % パラホルムアルデヒド (P F A) で灌流固定した後、速やかに抜脳し、  
15 手早く同一固定液にて  $4^{\circ}C$  で一晩後固定した。その後、脳組織をパラフィンで包埋し、 $4 mm$  の厚さの切片を作成した。A B C 法 (Vectorstain Elite ABC kit, Vector Labs, Burlingame, USA) にて免疫染色した。ウサギ抗ユビキチンポロクローナル抗体 (1:100; Dako, CA, USA) とマウス抗ハンチンチンモノクローナル抗体 (mEM48, 1:500; Chemicon,  
20 Temecula, USA) を用いた。D A B 発色した後、ヘマトキシリンにて後染色し、脱水、透明、封入後光顕で観察し写真を撮った。

個体レベルでの定量解析：

体重変化：生後 4 週齢から体重を週ごとに測定した。

尾吊り下げ試験：生後 4 週齢から 14 週齢の間、「発症」という判定する  
25 までの週ごとにマウスの尻尾を掴んで吊り下げて後肢が腹側に抱き込む姿勢をとるまでの時間を計った。判定標準として 15 秒以内に出てきた

ら発症という判定を下す。

生存期間：個別飼育にて病死までの寿命（日数）を記録した。

〔結果〕

（インビトロデータ）

- 5       COS-7 培養細胞を用いて、合成 siRNA の抑制効果を、発現コンストラクトと共にコトランスフェクトすることにより解析した。その結果、本発明者の siRNA は、siRNA によって効果が異なるものの、外因性 HD 遺伝子エクソン 1 の発現を抑制したことを示した（図 3～5、参考写真 1～3 参照）。調べた 3 種の siRNA のうち、siRNA-HD エクソン 1 は非常に高い効果を示し、培地中の siRNA の終濃度が 40 nM のときに、標的である導入遺伝子の発現を 80 % 以上抑制した。これに対して、他の 2 種の siRNA（siRNA-5'UTR、siRNA-CAG）は中程度から弱い効果しか示さなかった（図 6a、GFP 光による測定により判断）。さらに、本発明者は、2 種の siRNA による抑制効果は遺伝子特異的であるが、siRNA-CAG は、HD 遺伝子エクソン 1 が不在ベクターの発現を抑制する非特異的な抑制効果があることが観察された（図 6b）。予想通り、siRNA は、定量的 RT-PCR により推測された標的であるトランスフェクト遺伝子の mRNA 分解を誘導した。
- 20       ハンチントン病（HD）は選択的な神経細胞死によって引き起こされるものであり、神経細胞内の HD の発現を抑制することが最も重要である。神経細胞は RNAi に対し最も抵抗力があるとみなされてきたが（Gene 263, 103-112, 2001）、神経細胞内でうまく機能していることが実証された（PNAS 99, 18, 11926-11929, 2002）。本発明者による、siRNA と発現コンストラクトを、SH-sy5y（ヒト神経芽細胞腫）培養細胞内にコトランスフェクトした実験によれば、siRNA-HD
- 25

エクソン 1 が C O S - 7 細胞培養と比較して効果は少ないものの、他の 2 種の s i R N A は低程度の効果しかないか、もしくは効果がなかった (図 6 a)。

上記の結果により、s i R N A - H D エクソン 1 が、ハンチントン病 (H D) の発現を最も抑制することが明らかになったので、本発明者は、S H - s y 5 y 細胞における内因性 H D の発現に対する影響を調べた。H D m R N A の定量的測定により、s i R N A - H D エクソン 1 を使用してから 4 8 時間後には、内因性 H D 遺伝子の発現が 6 0 % 以上阻害されることが示された。ところが、G A P D H と  $\beta$  - アクチン両方の m R N A レベルはどちらも明らかに変化しなかったので、s i R N A - H D エクソン 1 が H D 遺伝子を特異的に抑制することが証明された (図 6 c)。(インビボデータ)

個体レベルでの効果は発症する証拠とする尾吊り下げ試験では s i R N A - H D エクソン治療群は有意に遅れることがわかった。また、5 週齢以後、未治療群 R 6 / 2 マウスにおける持続的な体重の減少と比べ s i R N A - H D エクソン治療群 R 6 / 2 マウスにおいては有意に改善された (図 7)。また、s i R N A - H D エクソン治療群と未治療群における累積生存率曲線の比較 (Kaplan-Meter 法) から、未治療群 (黒線) と比べ治療群 (赤線) の生存期間も有意に延長された (図 8)。

この臨床効果とともに、脳内では注入後 4 8 時間で線条体のミュータントのハンチンチンの m R N A 発現量が 6 0 パーセント減少した (図 9)。病理学的に抗ユビキチン抗体と抗ハンチンチン抗体を用いた免疫染色の結果、s i R N A - H D エクソン治療群では線条体におけるユビキチンとハンチンチン陽性の核内凝集体の出現頻度が両方とも顕著に減少していた (図 1 0)。第 1 0 図には、1 0 週齢の R 6 / 2 トランスジェニックマウスの線条体におけるハンチンチン及びユビキチン陽性の核内封入体

の免疫染色像が示されている。A－Fはハンチンチン、G－Hはユビキチンの染色性を示す。ハンチンチンの場合、全く検出されない野生型マウス（A，D）と比べR 6／2マウス（B，E，C，F）では、はっきりとした核内強陽性の所見が見られる。一方、s i R N A－HDエクソン治療群のマウス（C，F）では、対照となる未治療群（B，E）と比べ、核内封入体の数が顕著に減少している。同様にs i R N A－HDエクソン治療群のマウスのユビキチン核内封入体の数も減っている（Gは未治療群；Hはs i R N A－HDエクソン治療群）。

上記のように、ただ一回注入だけで生体内でハンチンチン遺伝子の転写レベルが抑制され、R 6／2マウスにおいて新しい核内凝集体の形成が減少しており、結果としてこのマウスの寿命が延びた。

#### [考察]

理想的なアプローチとしては、毒性が現れる前に、（35以上のC A Gリピートを持つ）変異対立遺伝子の発現を抑えることである。しかし、s i R N Aとそれぞれ異なるC A Gリピートの長さ（14～149）を含むコンストラクトとの組合わせたところ、抑制効果がC A Gリピートの長さとは無関係であることが明らかになった。

本研究により、s i R N Aの一つが、ハンチントン病（HD）の発現の特異的抑制を効率的に仲介することが明らかになった。R N A iは成熟したマウスにおいても機能することが示されたので（Nature 418, 38-39, 2002）、HD発現の効率的な抑制は、様々の種類の細胞及びモデル動物の生体内における内因性ハンチンチンを抑制した後、未だ解明されていないハンチンチンの機能を研究するのに有用である。s i R N A技術を治療法として利用することはHD患者の治療の戦略となりうる（Mol. Med. Today 3, 175-183, 1997）。特定の範囲でのHD発現の抑制により、疾病の進行を停止させることができる。なぜなら、ハンチン



チンの機能は、HD患者において発現した遺伝子産物の量に対して敏感に（もしくは、検出限界以下）現れるようには見えないからである（Cell 101, 57-66, 2000）。

## 5 産業上の利用可能性

本発明においては、ハンチンチン遺伝子発現を特異的かつ効率的に抑制する二重鎖RNA（dsRNA）の作製に成功した。本発明のdsRNAは、ゲノム中での配列の希少性の検索及びハンチンチン遺伝子産物の予測二次構造の検討結果からdsRNA配列を決定し、作製したものである。本発明のdsRNAは、RNA干渉により遺伝子発現を抑制するが、その効果が特異的かつ効率的であり、ハンチンチン遺伝子発現を特異的かつ効率的に抑制する。特に、本発明で構築された短二重鎖RNA（siRNA）は顕著な抑制効果を奏し、ハンチントン病の遺伝子治療実現化のための薬剤としての期待が大きい。

ハンチントン病は進行性で有用な治療法が確立されていない遺伝性疾患である故に、疾患原因である変異遺伝子を特異的かつ効率的に発現抑制すれば有用な治療法となると期待されている。本発明の二重鎖RNA（dsRNA）によるRNAi（RNA干渉）の応用は上記目的を達成するに有望な手段であり、ハンチントン病治療法の開発における本発明の寄与は大きい。

また、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症やMachado-Joseph病などはハンチントン病と共通の発症機序を持つトリプレットリピート病である。従って、本発明によるハンチントン病の治療方法の確立は、これらの共通点を持つ疾患の克服の可能性を広げるものである。

## 請 求 の 範 囲

1. ハンチンチン遺伝子の発現を抑制することができる、ハンチンチン  
mRNAの標的となる特定配列に相同なセンス鎖RNAとアンチセンス  
5 鎖RNAからなることを特徴とする二重鎖RNA。
2. ハンチンチンmRNAの標的となる特定配列が、配列表の配列番号  
1に示される塩基配列に由来するRNAであることを特徴とする請求項  
1記載の二重鎖RNA。
3. ハンチンチンmRNAの標的となる特定配列が、19～24bpの  
10 塩基配列であることを特徴とする請求項1又は2記載の二重鎖RNA。
4. 配列表の配列番号1に示される塩基配列に由来するRNAが、ハン  
チンチン遺伝子のエクソン1のCAGリピートの上流近傍の領域に由来  
するRNAであることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の二重  
鎖RNA。
- 15 5. ハンチンチン遺伝子のエクソン1のCAGリピートの上流近傍の領  
域に由来するRNAが、配列表の配列番号3に示される塩基配列及び配  
列表の配列番号4に示される塩基配列からなることを特徴とする請求項  
1～4のいずれか記載の二重鎖RNA。
- 20 6. 配列表の配列番号3に示される塩基配列において、1又は数個の塩  
基が欠失、置換或いは付加された塩基配列と該塩基配列に相補的な塩基  
配列からなることを特徴とする請求項1記載の二重鎖RNA。
7. 合成により製造されたセンス鎖RNAとアンチセンス鎖RNAから  
形成されたことを特徴とする請求項1～6のいずれか記載の二重鎖RNA。
- 25 8. 遺伝子組換え方法を用いることにより製造されたセンス鎖RNAと  
アンチセンス鎖RNAから形成されたことを特徴とする請求項1～6の

いずれか記載の二重鎖RNA。

9. 遺伝子組換え方法を用いることにより製造されたセンス鎖RNAとアンチセンス鎖RNAが、それらRNAをそれぞれ転写することができるDNAを組み込んだ発現ベクターを宿主細胞に導入し、生成されたRNAを取得することによって形成されたものであることを特徴とする請求項8記載の二重鎖RNA。

10. 請求項1～9のいずれか記載の二重鎖RNAからなるハンチンチン遺伝子の発現抑制剤。

11. 請求項1～9のいずれか記載の二重鎖RNAを、HIV-1由来のprotein transduction domainであるTAT配列に付加した融合物からなるハンチンチン遺伝子の発現抑制剤。

12. 請求項1～9のいずれか記載の二重鎖RNAと、正電荷リボソーム/脂質との複合体からなるハンチンチン遺伝子の発現抑制剤。

13. 請求項1～6のいずれか記載の二重鎖RNAを転写することができるDNAを組み込んだ発現ベクターからなるハンチンチン遺伝子の発現抑制剤。

14. 請求項10～13のいずれか記載の発現抑制剤を哺乳動物の生体或いは生体細胞に導入することを特徴とする哺乳動物の生体或いは生体細胞におけるハンチンチン遺伝子の発現を抑制する方法。

15. 請求項10～13のいずれか記載の発現抑制剤を有効成分として含有するハンチントン病の予防及び/又は治療薬。

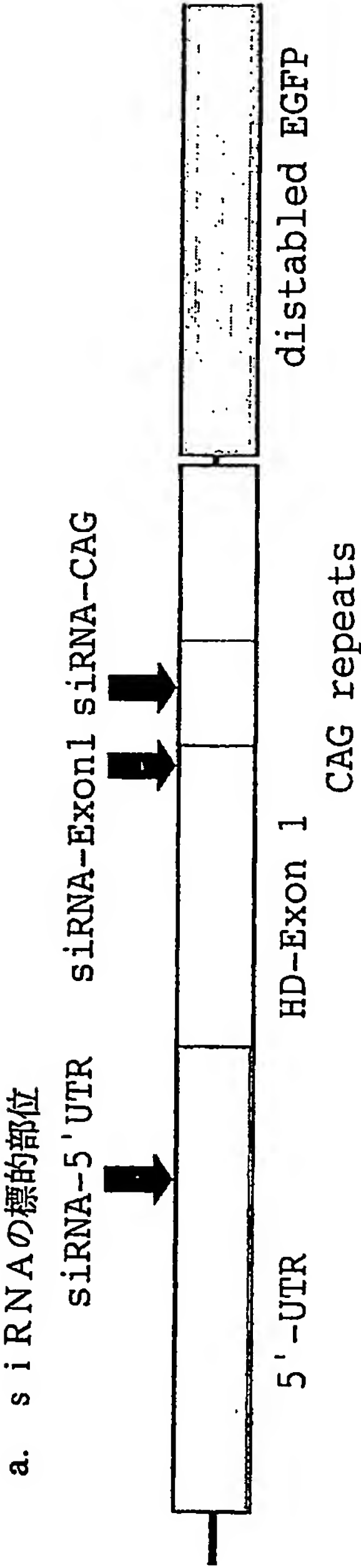
16. さらに薬学的に許容される担体を含むことを特徴とする請求項15記載のハンチントン病の予防及び/又は治療薬。

17. 請求項15又は16記載のハンチントン病の予防及び/又は治療薬を、哺乳動物の生体或いは生体細胞に導入することを特徴とするハンチントン病の発症の予防及び/又は治療方法。

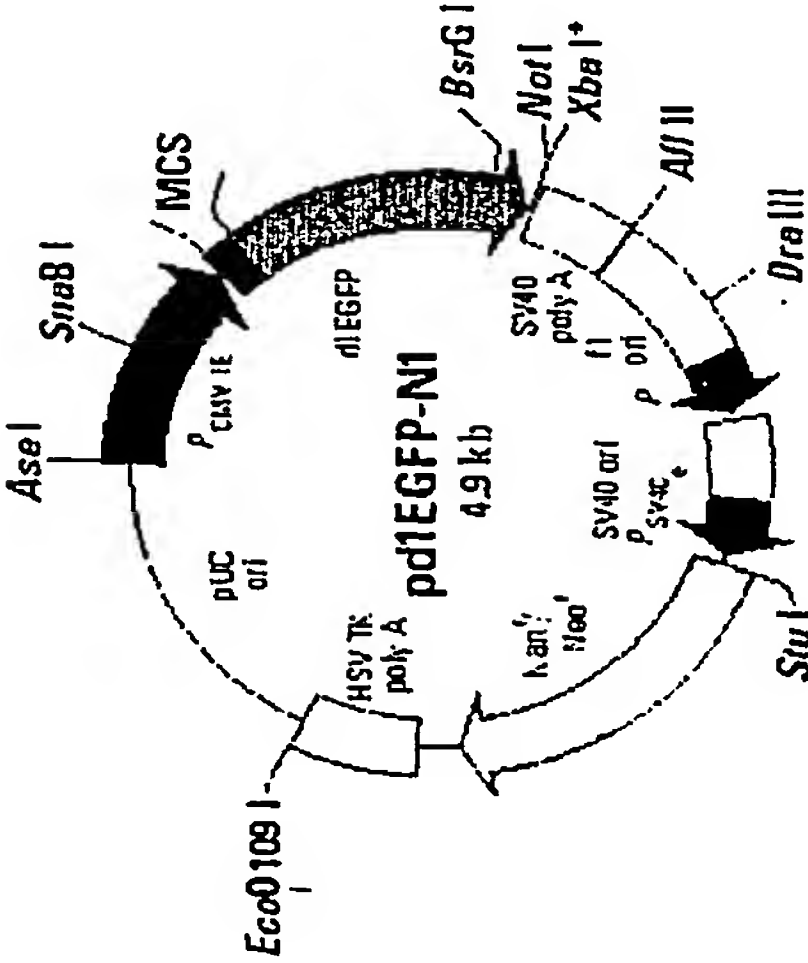




第 2 図



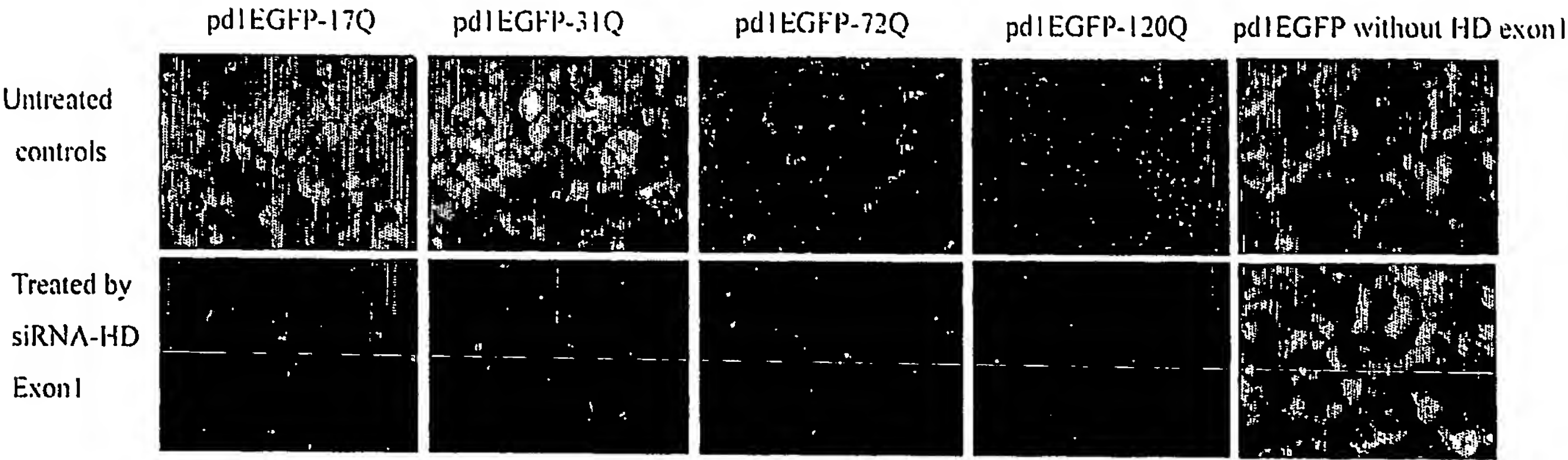
b. pd1EGFP N1



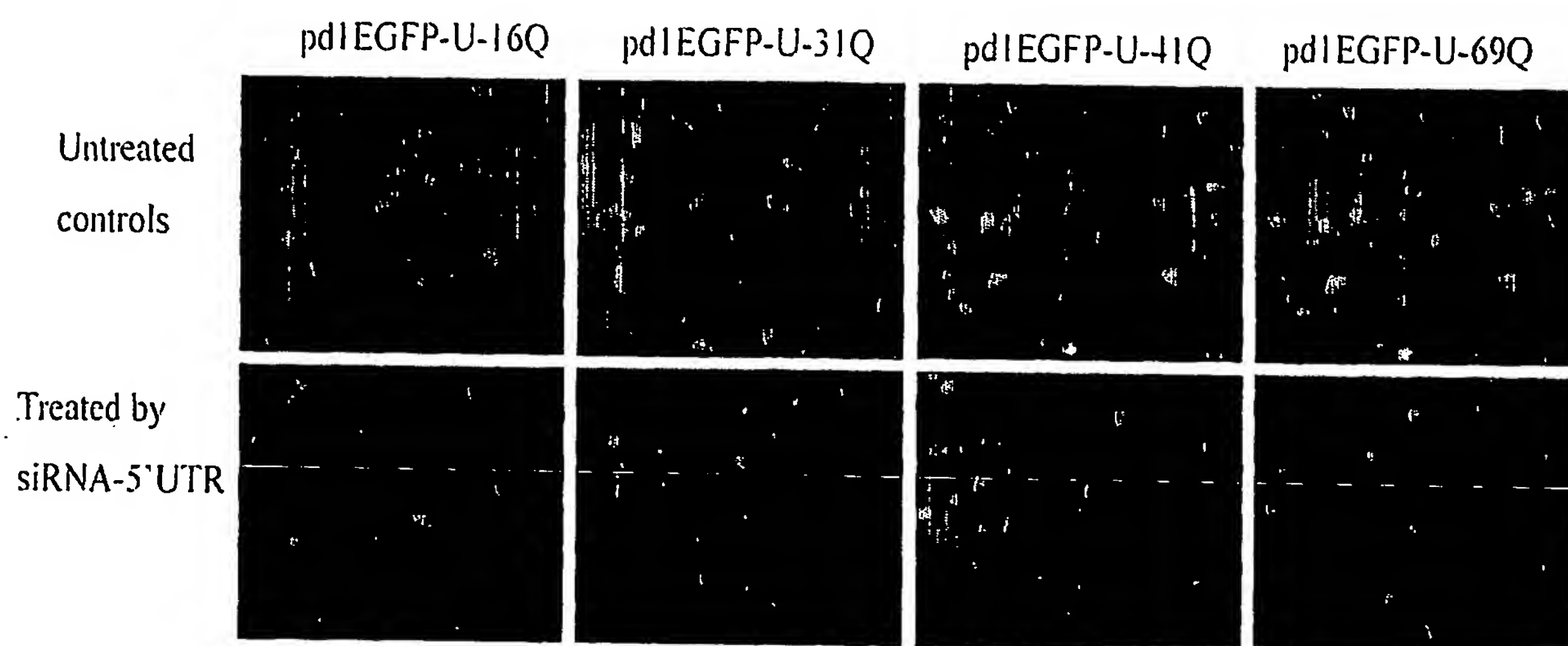
c. 構築物

	Normal	Mutant
With 5'-UTR	pd1EGFP-U-16Q, pd1EGFP-U-31Q	pd1EGFP-U-41Q, pd1EGFP-U-69Q
Translated region only	pd1EGFP-17Q, pd1EGFP-22Q, pd1EGFP-31Q	pd1EGFP-49Q, pd1EGFP-72Q, pd1EGFP-120Q, pd1EGFP-151Q

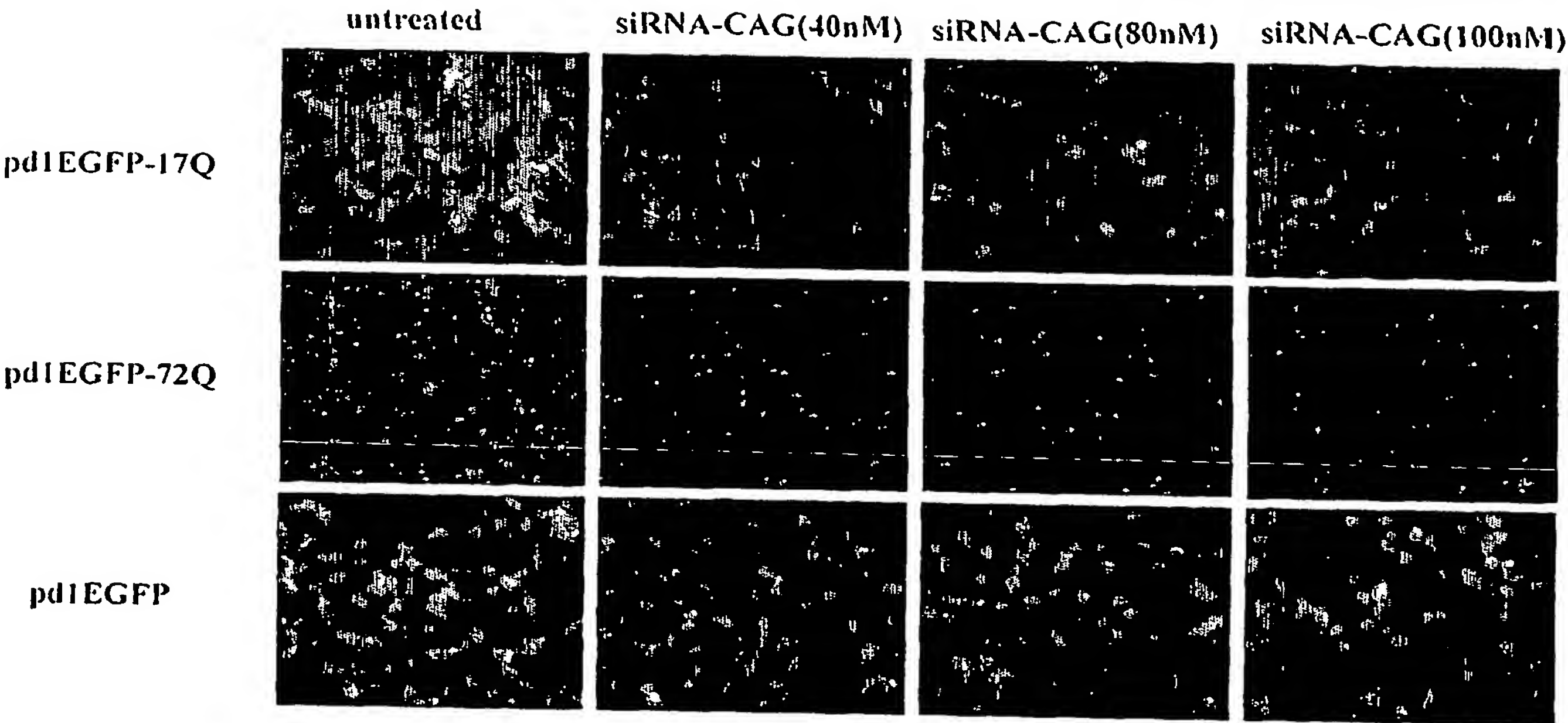
第 3 図



## 第 4 図

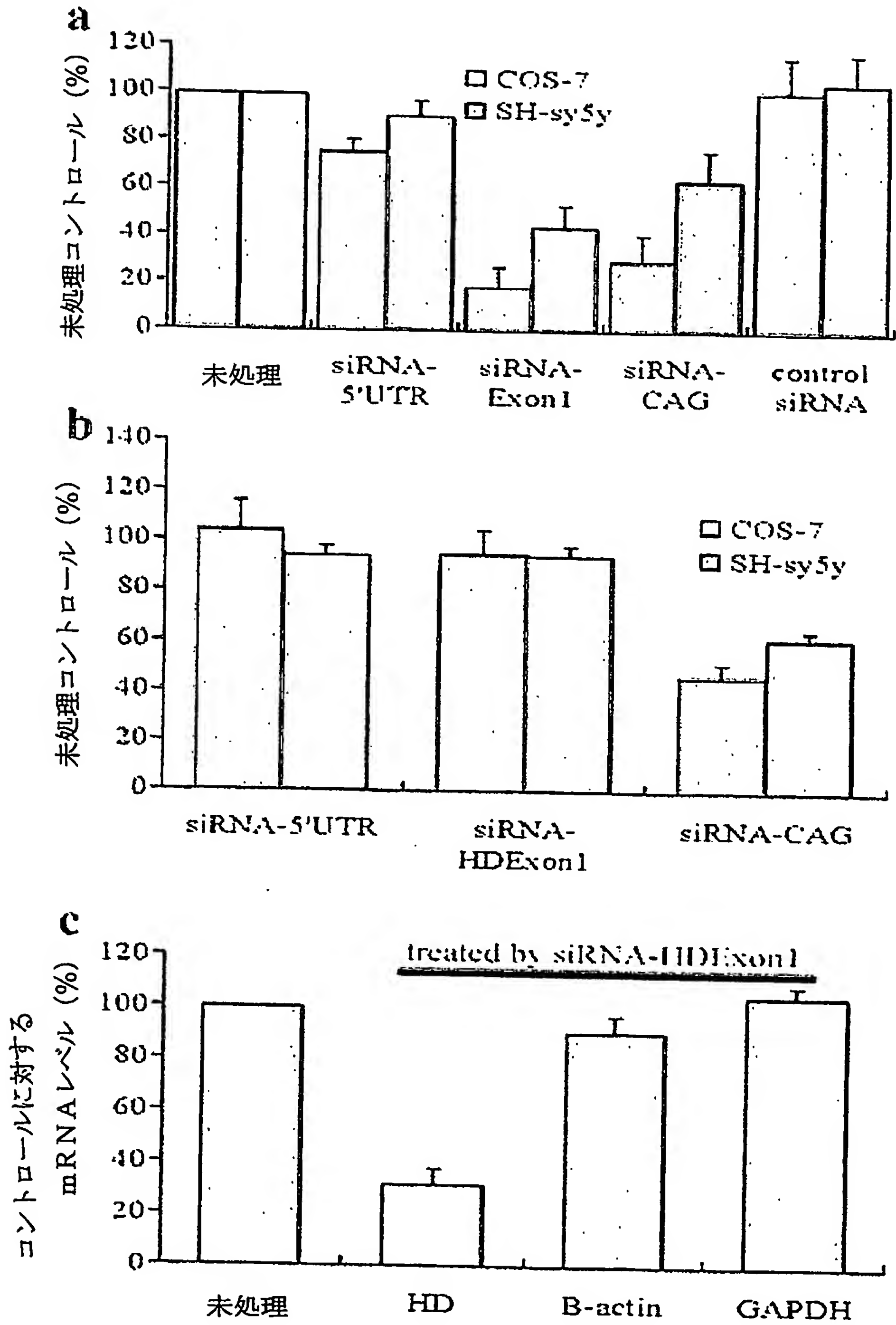


第 5 図

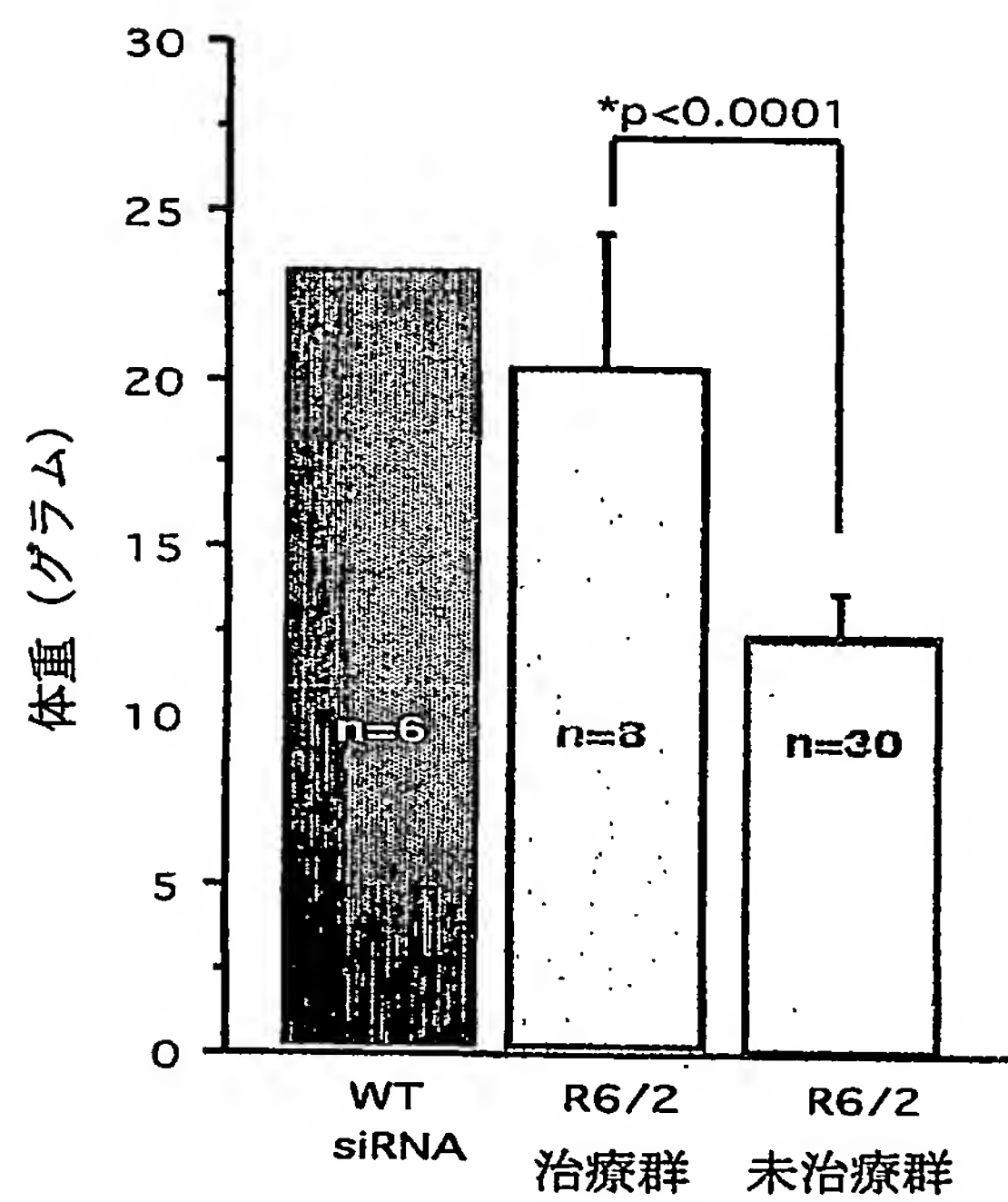




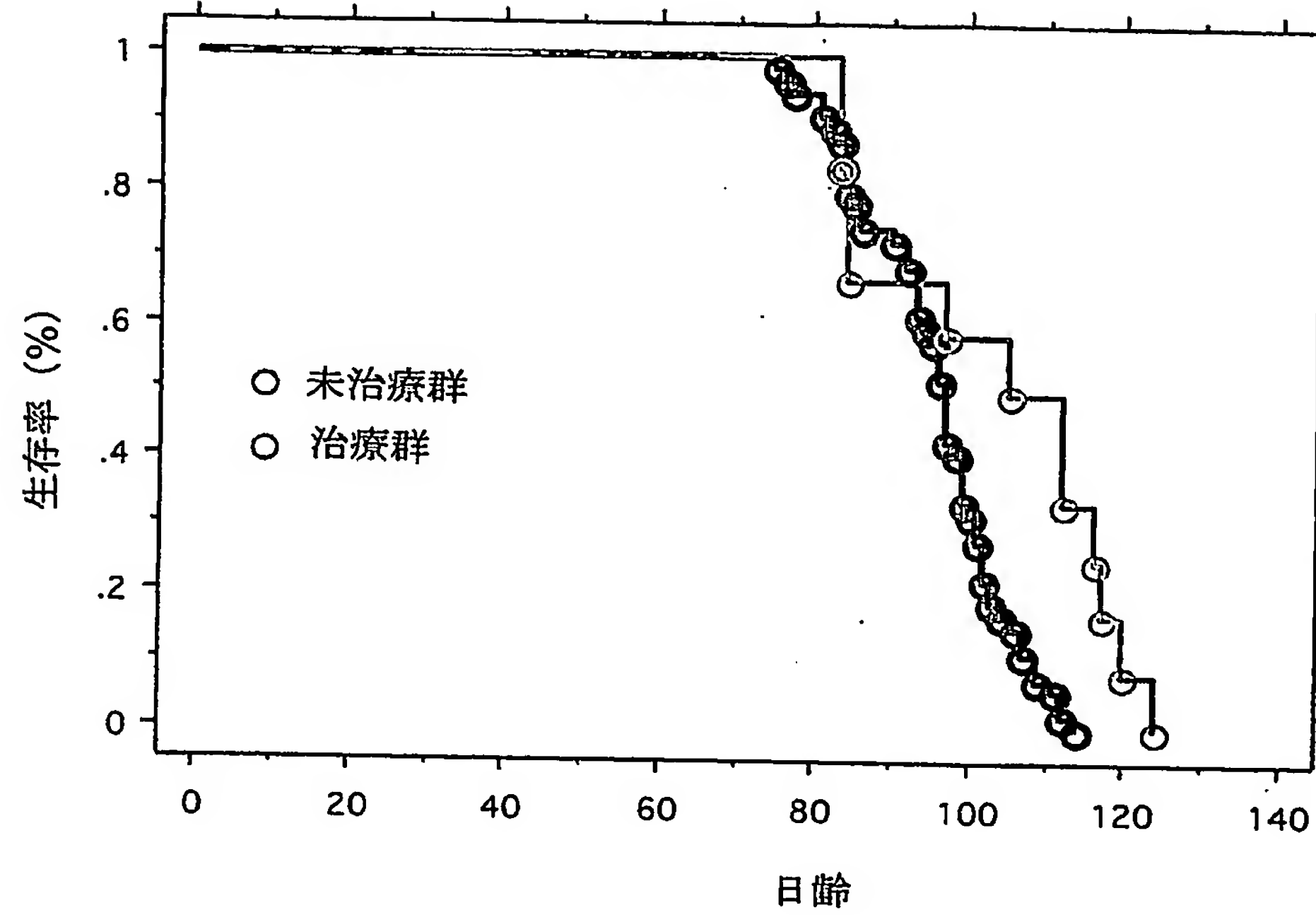
第 6 図



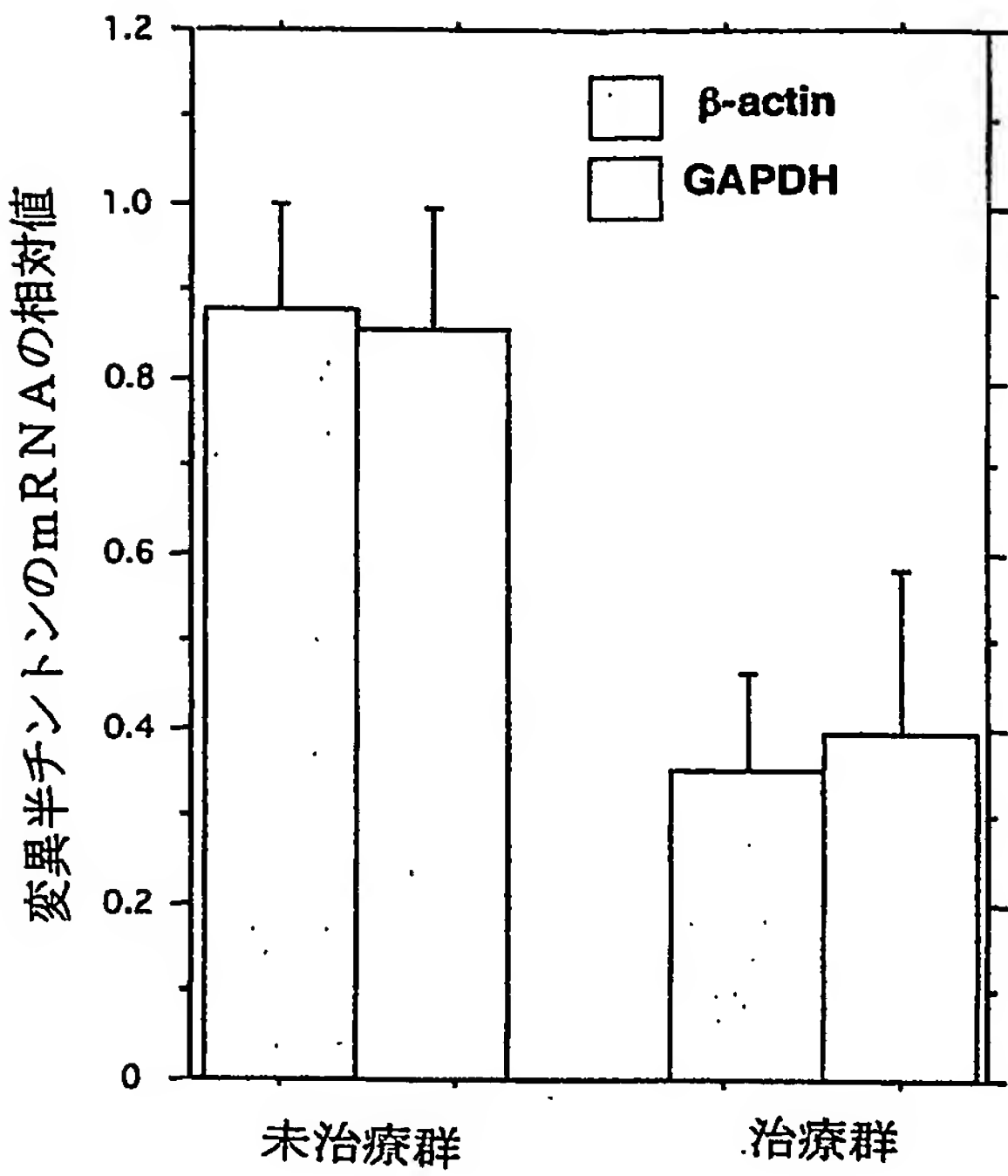
第 7 図



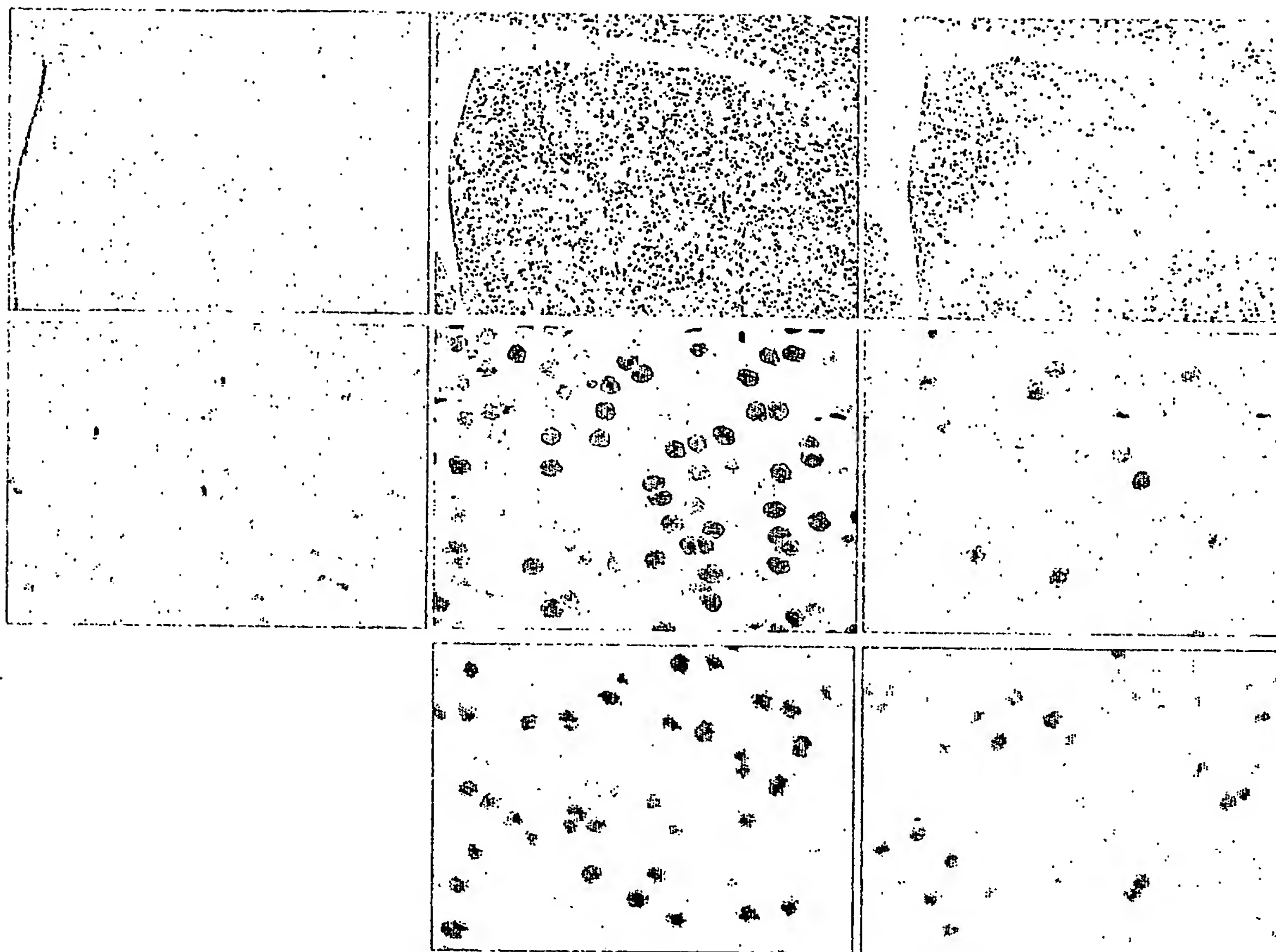
第 8 図



第 9 図



## 第 10 図





## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> Inhibition of Expression of Huntington's Disease

<130> B05-01PCT

<150> JP2003-136477

<151> 2003-05-14

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 584

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
ttgctgtgtg aggcagaacc tgcgggggca ggggcgggct ggttccctgg ccagccattg      60
gcagagtccg caggctaggg ctgicatatc tctggccgg cgtggccccg cctccgccgg      120
cgcgcccccg cctccgccgg cgcacgtctg ggacgcaagg cgccgtgggg gctgccggga      180
cgggtccaag atggacggcc gctcaggttc tctttttacc tgcggcccag agccccattc      240
attgccccgg tctgagcgg cgccgcgagt cggcccagg cctccgggga ctgccgtgcc      300
gggcgggaga ccgcatggc gaccctggaa aagctgatga aggccttcga gtccttcaag      360
tccttccagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag      420
cagcagcagc aacagccgcc accgccgccg ccgccgccgc cgccctccca gcttccctcag      480
```

ccgccgccgc aggcacagcc gctgctgcct cagccgcagc cgcccccgcc gccgcccccg 540

ccgccacccg gcccggtgt ggctgaggag ccgctgcacc gacc 584

<210> 2  
<211> 89  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Thr Leu Glu Lys Leu Met Lys Ala Phe Glu Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

Phe Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
20 25 30

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro  
35 40 45

Pro Pro Pro Gln Leu Pro Gln Pro Pro Pro Gln Ala Gln Pro Leu Leu  
50 55 60

Pro Gln Pro Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gly Pro  
65 70 75 80

Ala Val Ala Glu Glu Pro Leu His Arg  
85

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA-HD Exon1 sense RNA

<400> 3

gccuucgagu ccucaaguc c

21

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA-HD Exon1 antisense RNA

<400> 4

uccggaagcu caggaguuc a

21

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA-5' UTR sense RNA

<400> 5

gauggacggc cgcucagguu u

21

<210> 6

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA-5' UTR antisense RNA

<400> 6

uucuaccugc cggcgagucc a

21

<210> 7

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA-CAG sense RNA

<400> 7

gcagcagcag cagcagcagc a

21

<210> 8

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA-CAG antisense RNA

<400> 8

gucgucgucg ucgucgucgu c

21

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> forward primer

<400> 9

cgccgcctcc tcagcttcct

20

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> reverse primer

<400> 10

gcggtggagg cggcggcggc t

21



VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て(規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)) 氏名(姓名)	本国際出願 に関し、 独立行政法人科学技術振興機構 は、本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1(i)	開示の種類:	刊行物
VIII-5-1(ii)	開示の日付:	2003年 05月 06日 (06. 05. 2003)
VIII-5-1(iii)	開示の名称:	s i R N Aによるハンチンチン遺伝子発現の抑制
VIII-5-1(iv)	開示の場所:	第 4 4 回日本神経学会総会 プログラム・抄録集、第 8 5 頁
VIII-5-1(v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。:	すべての指定国

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006360

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/11, A61K48/00, A61K31/7088, A61P25/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/11, A61K48/00, A61K31/7088, A61P25/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GOTO, J. et al.; Suppression of huntingtin gene expression by siRNA: A possible therapeutic tool for Huntington's disease. Neurology 2003, March, Vol.60, No.5, Suppl.1, page A286	1-13, 15-16
X	Jun GOTO et al., "siRNA ni yoru Huntingtin Idenshi Hatsugen no Yokusei", Dai 44 Kai Societas Neurologica Japonica Sokai Program Shorokushu, 06 May, 2003 (06.05.03), page 85	1-13, 15-16
E, X	WO 2004/047872 A2 (MEDTRONIC INC.), 10 June, 2004 (10.06.04), (Family: none)	1-13, 15-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
10 August, 2004 (10.08.04)

Date of mailing of the international search report  
07 September, 2004 (07.09.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006360

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 7-067661 A (GEN. HOSPITAL. CORP.), 14 March, 1995 (14.03.95), & EP 614977 A2 & AU 9456429 A & CA 2116280 A & DE 69432031 E	1-13, 15-16
A	JP 2003-503008 A (VARIAGENICS INC.), 28 January, 2003 (28.01.03), & WO 00/52210 A2 & AU 200036121 A & EP 1216309 A2 & US 2003/0073123 A1	1-13, 15-16
P, X	LIU, W. et al., Specific inhibition of Huntington's disease gene expression by siRNAs in cultured cells. Proc.Jpn.Acad.Ser.B. 2003 December, Vol.79B, No.10, pages 293 to 298	1-13, 15-16

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/006360

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 14, 17

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 14 and 17 relate to methods for treatment of the human body by therapy.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C12N 15/11, A61K 48/00, A61K 31/7088, A61P 25/14		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C12N 15/11, A61K 48/00, A61K 31/7088, A61P 25/14		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	GOTO, J. et al. Suppression of huntingtin gene expression by siRNA: A possible therapeutic tool for Huntington's disease. Neurology 2003. Mar., Vol. 60, No. 5 Suppl 1, p. A286	1-13, 15-16
X	後藤 順 他, siRNAによるハンチンチン遺伝子発現の抑制 第44回日本神経学会総会プログラム・抄録集 2003. May. 6, p. 85	1-13, 15-16
E, X	WO 2004/047872 A2 (MEDTRONIC INC.) 2004. 06. 10 (ファミリーなし)	1-13, 15-16
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー		
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献		
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの		
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの		
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの		
「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	10. 08. 2004	国際調査報告の発送日
		07. 9. 2004
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	4 B 9 2 8 1
日本国特許庁 (ISA/JP)	高堀 栄二	
郵便番号100-8915	電話番号 03-3581-1101	内線 3448
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		



様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (2004年1月)

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 14、17 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲14、17は、人の身体の治療方法に関するものである。

2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**